Isolierung und Charakterisierung einer Substanz, die Kopfbildung bei Hydra induziert

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HILDEGARD SCHALLER
aus Alzey

1970

Isolierung und Charakterisierung einer Substanz, die Kopfbildung bei Hydra induziert

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HILDEGARD SCHALLER
aus Alzey

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	9.7.1970
Dekan:	Prof. Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Gierer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Schwartz

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER SUBSTANZ, DIE KOPFBILDUNG BEI HYDRA INDUZIERT

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0074

INHALTSANGABE

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	2
C. Ergebnisse	
1. Induzierende Aktivität des Rohextrakts	7
2. Korrelation zwischen Regenerationsfähigkeit, Knospungspotenz und induzierender Aktivität des Rohextrakts	10
3. Messung des Gradienten der induzierenden Aktivität	12
4. Regenerationshemmung durch konzentrierten Rohextrakt	16
5. Aktivität des Rohextrakts bei der Regeneration eines Kopfes	17
6. Korrelation der Aktivität des Rohextrakts mit dem Auftreten bestimmter Zellarten	21
7. Anreicherung von Nervenzellen durch Zelltrennung und Korrelation mit der induzierenden Aktivität	26
8. Lokalisation der induzierenden Substanz in strukturgebundener Form	28
9. Strukturgebundene niedermolekulare Komponente	32
10. Reinigung der niedermolekularen Substanz	33
11. Charakterisierung der niedermolekularen Substanz	
a) Molekulargewicht	34
b) Peptidnachweis	40
c) Weitere Eigenschaften	41

Seite

12. Wirkungsweise der gereinigten Substanz im Vergleich zu der Wirkung des Rohextrakts 41

D. Diskussion 42

E. Zusammenfassung 48

F. Literaturangaben 49

Einleitung

Seit mehr als 200 Jahren (Trembley, 1744) ist der Süßwasserpolyp Hydra wegen seiner großen Regenerationsfähigkeit ein bevorzugtes Objekt, um morphogenetische Prozesse zu studieren. Besonders interessant ist die Frage, wie die Polarität des Tieres zustandekommt. Theorien über die Erzeugung und Erhaltung der Polarität gehen häufig von der Annahme aus, daß es innerhalb eines Tieres Gradienten diffusibler Stoffe gibt, die induzierend oder inhibierend auf Differenzierungsvorgänge einwirken. Experimentelle Verfahren zur Untersuchung und Messung solcher Gradienten, ihrer Entstehung und ihrer Wirkungsweise sind für die Entwicklungsphysiologie von grundlegender Bedeutung.

Für den Süßwasserpolyp Hydra gibt es experimentelle Ansätze, um derartige Stoffgradienten zu messen und zu untersuchen. Lesh und Burnett (1964, 1966) fanden in Extrakten von Hydra eine niedermolekulare Substanz, die in regenerierenden Teilstücken von Hydra überzählige Tentakel (bzw. überzählige Köpfe) induziert. Lentz (1965) wies induzierende Wirkungen in einer bestimmten Zellfraktion nach, die unter anderem neurosekretorische Granula enthielt; er schloß aus diesem und anderen Hinweisen, daß das Nervensystem von Hydra für die Aufrechterhaltung der Polarität verantwortlich ist.

Transplantiert man ein Gewebestück von einer Hydra in die Gastralregion einer zweiten Hydra, so wird die Bildung

eines sekundären Kopfes induziert, sofern das Transplantat der kopfnahen Region entstammt. Ein Gewebestück aus der kopffernen Region wird resorbiert (Webster und Wolpert, 1966). Bei der Regeneration von größeren Teilstücken von Hydra produziert ein kopfnahes Stück mehr Tentakel in kürzerer Zeit als ein Stück aus der kopffernen Region. Diese Befunde lassen es als gerechtfertigt erscheinen, einen Zusammenhang zwischen Kopfinduktionskapazität und Tentakelzahl anzunehmen.

In der folgenden Arbeit wird über die Isolierung und Charakterisierung einer induzierenden Substanz berichtet, die in Regeneraten zu überzähligen Tentakeln führt. Sie wurde auf Vorkommen in den verschiedenen Regionen, in bestimmten Zellarten und Zellfraktionen und in ihrer Abhängigkeit vom Wachstums- und Regenerationszustand des Tieres untersucht. Die Ergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, daß die induzierende Substanz von Nervenzellen produziert wird. Untersuchungen zur Struktur der Substanz zeigen, daß sie ein Molekulargewicht von etwa 1000 hat; sie ist sensitiv gegen Degradierung mit Peptidasen, d.h. sie ist oder enthält ein Peptid.

Material und Methoden

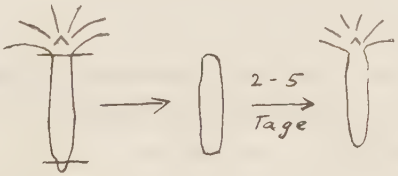
Versuchsobjekt: Für alle Versuche wurde Hydra attenuata benutzt.

Massenkultur: (nach Loomis und Lenhoff, 1956): In Zehnliterschalen wurden je 2-3000 Hydren bei 18-20°C gezüchtet. Sie

wurden täglich mit Artemia salina gefüttert, das Medium wurde einmal pro Tag gewechselt.

Hydramedium: 10^{-3} M $CaCl_2$, 1,25 × 10^{-5} M EDTA in Leitungswasser.

Regenerationstest: 24 Stunden gehungerte Hydren aus der Massenkultur wurden mehrmals gewaschen und in 2,5% Tylose MH 4000 (Farbwerke Hoechst) unter einem Binokular geschnitten. Für den Test wurden als Standardhydren Hydren ohne Knospen benutzt, denen der Kopf und auch die Fußscheibe (wegen Verhinderung von Verschmutzung, vor allem Verpilzung) entfernt wurden. Nach nochmaligem Waschen wurden die zu testenden Mittelstücke in Petrischalen (6 cm Durchmesser) mit 10 ml Testmedium transferiert. Pro Testschale regenerierten 25 - 40 Tiere.



Für jeden Meßwert wurden 3 Schalen angesetzt. Für die Verdünnungsreihen wurden die Lösungen jeweils um den Faktor 3 verdünnt. Das Testmedium wurde nach 4-24 Stunden durch Hydramedium ersetzt. Die Regenerate wurden nach 2-5 Tagen ausgezählt. Bestimmt wurde die Induktionskapazität I als prozentuale Erhöhung der durchschnittlichen Tentakelzahl T gegenüber der Kontrolle K ($I = 100 \times \frac{T-K}{K}$).

Rohextrakt: x Hydren wurden in dest. Wasser 3-5 min. lang unter Eiskühlung mit einem MSE Ultraschallgerät mit 1,5-2 A

beschallt. Dieser Rohextrakt wurde zum Test mit Hydra-medium (s.o.) verdünnt und die Absorption bei 280 mμ als ungefähres Maß für die Konzentration gemessen. Eine Hydra/ml ohne Knospen hat eine optische Dichte bei 280 mμ von etwa 0,15, eine Hydra mit Knospen etwa 0,30.

Auflösung in Zellen: Die Hydren wurden in Macerationsmedium (7% Glycerin, 7% Essigsäure) 5-10 min. lang geschüttelt, bis alles Gewebe aufgelöst war.

Zellzählung: Die Zahl der Zellen pro Hydra oder Region wurde in einer Neubauer-Zählkammer, 0,01 mm tief, bestimmt.

Zelltrennung im Glycerin- oder Saccharosegradienten: Die Hydren wurden in Macerationsmedium oder in 1% Essigsäure in Zellen zerlegt. Diese Zellen wurden 5 min. bei 1000 g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand weggegossen und die sedimentierten Zellen entweder (1) auf einen diskontinuierlichen Glyceringradienten (50, 30, 25, 20, 15% Glycerin in 7% Essigsäure) oder (2) auf einen Saccharose-gradienten (60, 40, 20, 10, 5% Saccharose in 1% Essigsäure) geschichtet. In beiden Fällen wurde 3-4 min. lang bei 500 g zentrifugiert und die 5 Banden der Zwischenschichten von oben vorsichtig abpipettiert. Die Zellen wurden ausgezählt, in 0,4 M Saccharose (iso-osmolar) gewaschen und 10 min. bei 3000 g resedimentiert, um Glycerin oder Saccharose zu entfernen. Das Sediment wurde in dest. Wasser aufgelöst, 5 min. ultrabeschallt und wie üblich als Rohextrakt getestet. Methode (1) hat den Vorteil, daß Zellen in Glycerin besser erhalten bleiben, dagegen stört Glycerin im Test durch seine

regenerationshemmende Wirkung. In 1% Essigsäure ohne Glycerin (Methode 2) und im Saccharosegradienten zerfallen die Zellen schneller. Beide Methoden führen zu ähnlichen Zellverteilungen in den verschiedenen Banden.

Homogenisation: Die Hydren wurden in einem Glas- oder Teflonhomogenisator in Eis vorsichtig homogenisiert, bis alle Zellen aufgebrochen waren. Als Homogenisationspuffer wurden verwendet:

1. Puffer A: 0,4 M Saccharose, 0,01 M Tris-Cl, pH 7,4, 10^{-3} M $MgCl_2$, 4 x 10^{-3} M $CaCl_2$, und in einigen Versuchen - so angegeben - 10^{-2} M EDTA, 0,1-0,5% Triton-X-100.
2. Puffer B: wie A, statt 0,4 M Saccharose 0,2 M NaCl.
3. Puffer C: 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-Cl, pH 7,4.

Differentielle Zentrifugation: x ml Hydrahomogenat wurden in der Spinco (Model L) Ultrazentrifuge im 30er Rotor bei 5°C 10 min. bei 3000 g, der erste Überstand 10 min. bei 10 000 g und der zweite Überstand 60 min. bei 35 000 g zentrifugiert. Die Sedimente wurden in Puffer A oder B aufgerührt und bis zum Test eingefroren.

Dichtegradientenzentrifugation (Zentrifugation zum Gleichgewicht):

1. 30-60% diskontinuierlicher Saccharosegradient: Auf 10 ml 60% Saccharose wurden 10 ml 40%, 5 ml 30% und 5 ml 35 000 g Sediment in 14% Saccharose geschichtet. Dieser Gradient wurde bei 5°C und 20 000 UpM 2-8 Stunden in

einem SW 25/1 Rotor zentrifugiert, die Banden durch Austropfen entnommen, mit Puffer A verdünnt und zum Konzentrieren der Partikel 60 min. bei 35 000 g rezentrifugiert. Das Sediment wurde in Puffer B aufgelöst und bis zum Test eingefroren oder in Puffer A aufgelöst und auf den nächsten Gradienten geschichtet.

2. 20-30% kontinuierlicher Saccharosegradient: In einer Gradientenmischmaschine wurden je 7 ml 20 und 30% Saccharose miteinander gemischt und in einen Zentrifugenbecher eingefüllt, in dem 0,2 ml 60% Saccharose als Polster (zur Verhinderung von Sedimenten) untergeschichtet war. Auf diesen Gradienten wurden 1,5 ml der 30% Saccharose-Bande aus dem unter 1 beschriebenen 30-60% Saccharose-Gradienten geschichtet und in einem SW 25/3 Rotor 2-9 Stunden bei 20 000 UpM und 5°C zentrifugiert. Durch Austropfen wurden 15 Banden entnommen, die Banden mit Puffer A verdünnt und bei 35 000 g 60 min. rezentrifugiert, das Sediment jeweils in Puffer B aufgenommen und bis zum Test eingefroren oder auf den nächsten Gradienten geschichtet.

Säulenchromatographie:

1. Bio-Gel P-2 wurde in dest. Wasser aufgelöst, einige Stunden zum Quellen stehengelassen, in die Säule gefüllt und mit Puffer C gewaschen. Das Eluat wurde durch einen automatischen UV Recorder geführt und im Fraktionssammler verteilt. Die einzelnen Fraktionen wurden entweder weiter fraktioniert oder bis zum Test eingefroren. Säulengröße: 4 × 60 cm zur Chromatographie des Essigsäureüberstandes, 1 × 60 cm zum Konzentrieren.

2. Sephadex G-10 wurde über Nacht gequollen, ansonsten wie P-2 vorbereitet. Als Elutionsmittel wurde Puffer C oder zum Entsalzen dest. Wasser benutzt. Säulengröße: 1,5 × 17 cm, 1 × 10 cm zum Entsalzen.

3. DEAE-Sephadex A-25 wurde wie vom Hersteller beschrieben vorbereitet, d.h. auf pH 7,4 und 0,01 M Tris-Cl äquilibriert, die Probe aufgetragen, mit 0,01 M Tris nachgewaschen und entweder ein kontinuierlicher NaCl-Gradient angehängt oder in Stufen eluiert. Säulengröße: Pasteurpipette mit 0,5 ml DEAE A-25.

Diaflo-Ultrafiltration: Eine definierte Menge aktiver Substanz wurde in dest. Wasser in die Ultrafiltrationszelle (Amicon) eingefüllt und diafliert. Benutzt wurden folgende Membranen: UM-10 mit einer Trenngrenze bei 10 000 MG, UM-2 mit 1000 MG und UM-05 mit 500 MG.

Gleichgewichtszentrifugation: 500 und 1000 BU der aktiven Substanz wurden in 0,5 M NaCl, insgesamt 2 ml, in ein Zentrifugenröhrchen eingefüllt, mit Paraffin überschichtet und 8 Tage lang bei 60 000 UpM und 5°C in einem SW 65 Rotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 5 Fraktionen zu 0,4 ml von unten ausgetropft und bis zum Test eingefroren.

Ergebnisse

Induzierende Aktivität des Rohextrakts

Für einen quantitativen Test der Wirkung induzierender Faktoren wurden Mittelstücke von Hydren (25-40) nach dem Schneiden

für 4-6 Stunden mit der zu testenden Fraktion inkubiert. Eine Kontrollgruppe von Hydren der gleichen Charge wurde unter gleichen Bedingungen geschnitten und ohne die zu testende Fraktion inkubiert. Nach 2-4 Tagen wurden die Tentakel der regenerierenden Hydren gezählt. Die prozentuale Erhöhung der Tentakelzahl T gegenüber der Kontrollgruppe K wurde als Maß für die Induktionskapazität I der getesteten Fraktion benutzt ($I = 100 \times \frac{T-K}{K}$).

Untersucht man die stimulierende Wirkung eines Hydrarohextrakts in Abhängigkeit von der Konzentration, so ergibt sich das in Abb. 1 gezeigte Wirkungsspektrum. Als Maß für die Konzentration des Extrakts wird die Zahl der Hydren pro Milliliter angegeben, die zur Gewinnung dieser Konzen-

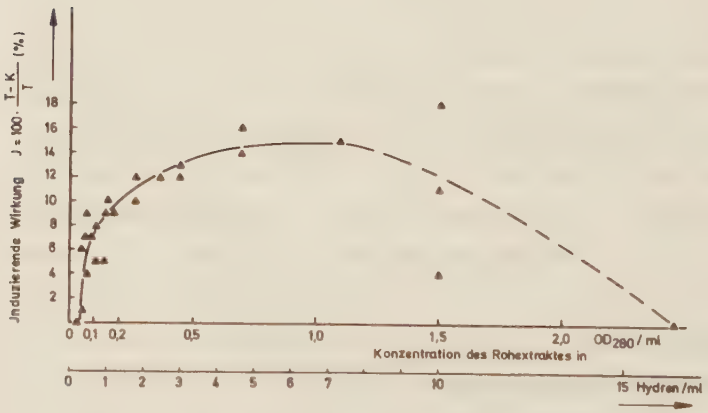


Abb. 1 Induzierende Wirkung des Rohextrakts in Abhängigkeit von der Konzentration

tration des Rohextrakts verwendet wurden. Dieser Konzentration entspricht jeweils eine bestimmte UV-Absorption bei 280 mμ, wie aus Abb. 1 hervorgeht.

Der Rohextrakt wirkt stimulierend, wenn man ihn stark genug verdünnt. Dies steht im Gegensatz zu Angaben von Lesh und Burnett (1966) und Müller (1969), die nur nach Erhitzen auf 100°C im Rohextrakt eine Aktivität nachweisen konnten. Der stimulierende Effekt ist nicht sehr groß: maximal erhöht sich die Tentakelzahl um 15% gegenüber der Kontrolle, d.h. jede Hydra hat durchschnittlich eine Tentakel mehr als ein unbehandeltes Kontrollregenerat.

Um verschiedene Extrakte miteinander zu vergleichen, d.h. um die Konzentration an Induktor in dem jeweiligen Extrakt zu bestimmen, ist es erforderlich, eine Verdünnungsreihe durchzutesten, zu interpolieren und jeweils die Konzentration des Extrakts anzugeben, die eine bestimmte induzierende Wirkung hervorruft. Zur Bestimmung der induzierenden Aktivität erwies es sich als günstig, zwei Begriffe einzuführen: 1) den Schwellenwert und 2) die biologische Einheit. Als Schwellenwert wird die Konzentration bezeichnet, die reproduzierbar zu einer Erhöhung der Tentakelzahl um etwa 5% führt. Bei der Rohextraktkurve wird dieser Schwellenwert bei einer Konzentration von 0,06-0,07 $O.D._{280}$/ml erreicht, was dem Extrakt aus einer halben Hydra im ml entspricht. Als eine biologische Einheit (BU) ist die Konzentration definiert, die in einer Testschale mit 10 ml Inhalt die Tentakelzahl um etwa 10% erhöht. Bei der Rohextraktkurve wird

diese Stimulierung mit dem Extrakt aus 10 Hydren erreicht, was einer Konzentration von 0,15-0,20 $O.D._{280}$/ml entspricht. In Versuchen, in denen die Aktivität einer Lösung in biologischen Einheiten zu bestimmen war, wurde der Rohextrakt aus 10 Hydren als Referenz mitgetestet.

In höheren Konzentrationen wirkt der Rohextrakt hemmend auf die Regeneration. Die Tentakelzahl ist gegenüber der Kontrolle nicht mehr stimuliert, die Tiere brauchen länger, einen Kopf zu regenerieren.

Korrelation zwischen Regenerationsfähigkeit, Knospungspotenz und induzierender Aktivität des Rohextrakts

Wenn man Hydren längere Zeit hungern läßt, nimmt der Anteil der Tiere mit Knospen immer mehr ab. Die Hydren hören schließlich auf, sich ungeschlechtlich fortzupflanzen. Im Extremfall (und bei gutem Mond) gehen sie in den sexuellen Zustand über und produzieren Gonaden. Je schlechter gefüttert eine Kultur ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß Hydren ohne sichtbare Knospen bereits Knospenanlagen in sich tragen. Den Anteil der Tiere mit Knospenanlagen kann man ungefähr abschätzen, indem man in einer Vergleichsgruppe 2 Tage später die Zahl der Tiere mit ausgewachsenen Knospen bestimmt. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, enthält in einer gut gefütterten Kultur etwa jede zweite Hydra eine nicht sichtbare Knospenanlage, in gehungerten Kulturen ist das nur noch jedes zehnte Tier, bei sexuellen Hydren gibt es keine Tiere mehr mit Knospenanlagen. Mit der Knospungspotenz nimmt auch die Rege-

Tabelle 1 Vergleich von Rohextrakten aus Hydren in verschiedenem Ernährungszustand

Charakterisierung des Ausgangsmaterials für den Rohextrakt					Aktivität des Rohextrakts			
					Schwellenwert		1 BU	
Hydren ohne Knospen aus einer Kultur von	Knospungspotenz: Zahl der Knospenanlagen/Hydra	Regenerationsfähigkeit: mittlere Tentakelzahl/Regenerat nach 3 Tagen	Rohextrakt aus	$O.D._{280}$/Stück	$O.D._{280}$/ml	Stck./ml	$O.D._{280}$/ml	Stck/ml
(1) gut gefütterte Hydren (Standard-Hydren)	0,50	6,11	ganzen Hydren ob. Hälfte unt.Hälfte	0,13-0,16 0,05-0,06 0,08-0,10	0,07 0,05 0,10	0,5 1 1	0,13	1
(2) schlechter gefütterte Hydren	0,20	5,86	ganzen Hydren ob. Hälfte unt.Hälfte	0,11-0,14 0,05-0,06 0,06-0,08	0,14 0,09 0,20	>1 <2 2,5	0,23	2
(3) Hungerhydren	0,05	5,38	ganzen Hydren ob. Hälfte unt.Hälfte	0,07-0,11 0,03-0,05 0,04-0,06	0,21 0,11 0,30	2 3 6	0,8	10
(4) sexuelle Hydren	0	4,82	ganzen Hydren ob. Hälfte unt.Hälfte	0,05-0,08 0,02-0,03 0,03-0,05	0,30 0,15 0,48	5 7 12	>1,0	>15

Die verschiedenen Kulturen wurden jeweils 2 Monate lang (1) täglich normal gefüttert, (2) täglich schlecht gefüttert, (3) zweimal wöchentlich gefüttert, (4) einmal wöchentlich gefüttert.

nerationsfähigkeit ab. Gehungerte Hydren brauchen länger, einen abgeschnittenen Kopf zu regenerieren, d.h. sie produzieren weniger Tentakel in einer gegebenen Zeit als gut gefütterte. Bei den in Tabelle 1 beschriebenen Hydren hatten die Regenerate aus gut gefütterten Kulturen nach 3 Tagen durchschnittlich 6,1 Tentakel, während Regenerate aus sexuellen Kulturen nur 4,8 Tentakel in dieser Zeit produzierten.

Stellt man aus Hydren ohne Knospen, aber mit verschieden hoher Zahl von Knospenanlagen, Rohextrakte her und testet diese Extrakte im üblichen Regenerationstest mit Mittelstücken von Standardhydren auf ihre induzierende Wirkung, so kommt man zu den in Tabelle 1 und in Abb. 2 zusammengestellten Aktivitäten.

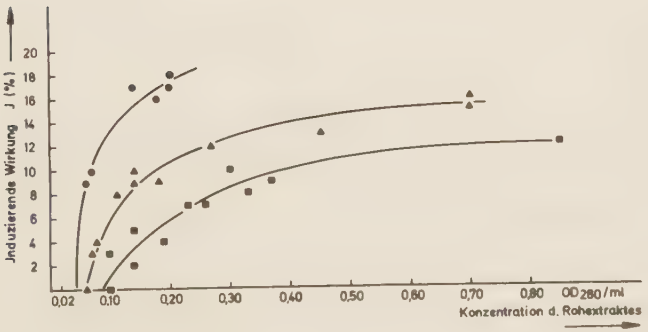


Abb. 2 Induzierende Wirkung des Rohextrakts aus Hydren mit verschieden hoher Zahl von Knospenanlagen. ●-●-● mehr als 0,6 Knospenanlagen/Tier, ▲-▲-▲ 0,3-0,6 Knospenanlagen/Tier, ■-■-■ 0-0,3 Knospenanlagen/Tier.

In Korrelation mit der Regenerations- und Knospungspotenz und abhängig vom Ernährungszustand der Tiere nimmt auch die Aktivität der Rohextrakte ab. Während gut gefütterte Hydren bei einer Konzentration von 1 Hydra im ml oder 0,13 $O.D._{280}$/ml die Aktivität von 1 BU erreichen, braucht man für den gleichen Effekt 10 Hungerhydren im ml oder 0,8 $O.D._{280}$/ml.

Um die Frage zu entscheiden, ob die Abnahme der Aktivität nur auf der geringeren Zahl von Knospenanlagen beruht, oder ob auch andere Regionen bei gehungerten Hydren weniger aktiv sind, wurden die Tiere halbiert und die Extrakte je aus der oberen und der unteren Hälfte getrennt getestet. Wie Tabelle 1 und Abb. 3 zeigen, ist die Aktivität in der oberen Hälfte immer höher als in der unteren.
In beiden Hälften nimmt die Aktivität in Abhängigkeit vom Ernährungszustand ab, in der unteren stärker als in der oberen.
Die Abnahme der Aktivität beruht also einerseits auf der geringeren Zahl von Knospenanlagen in der unteren Hälfte des Tieres, zum anderen aber auch auf der geringeren induzierenden Wirkung des Extraktes aus dem restlichen Tier.

Messung des Gradienten der induzierenden Aktivität

Aus den vorher beschriebenen Versuchen geht hervor, daß die Aktivität des Rohextrakts der oberen Hälfte des Tieres höher als die der unteren ist. Um die Frage zu beantworten, ob die Aktivität nur auf die Kopfregion und die Knospenanlage beschränkt ist, oder ob die anderen Regionen ebenfalls

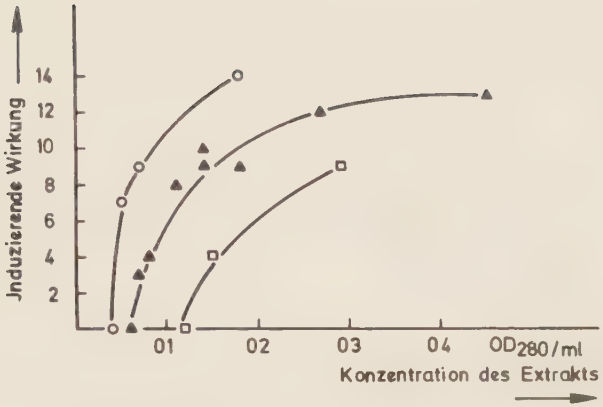
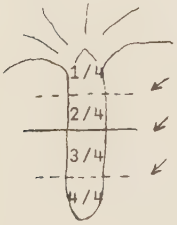


Abb. 3 Induzierende Wirkung des Extrakts aus ganzen Hydren im Vergleich zu Extrakten aus der oberen und der unteren Region. Benutzt wurden Hydren ohne Knospen mit 0,3-0,6 Knospenanlagen/Tier.
o-o-o Extrakt aus der oberen Hälfte; □-□-□ Extrakt aus der unteren Hälfte; ▲-▲-▲ Extrakt aus ganzen Hydren.

aktiv sind, wurden Hydren ohne Knospen in vier Teile geschnitten und die Extrakte jeweils auf ihre Aktivität untersucht.



Bezeichnung	O.D.$_{280}$/Stück
1/4 (Kopfregion)	0,04-0,05
2/4 (kopfnahe Region)	0,04-0,05
3/4 (Knospungsregion)	0,04-0,05
4/4 (Fußregion)	0,02-0,03

Das Ergebnis des Aktivitätstests ist in Abb. 4 dargestellt.

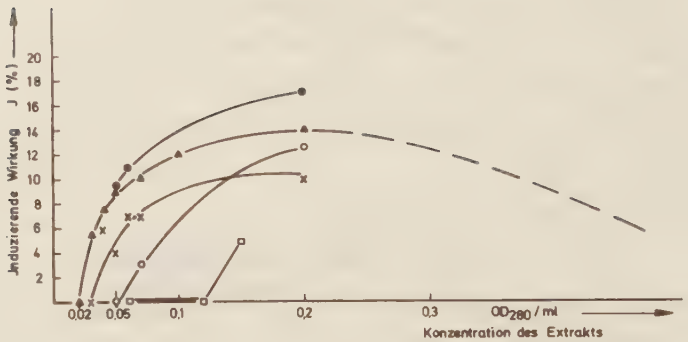


Abb. 4 Induzierende Wirkung des Rohextrakts aus 4 verschiedenen Regionen der Hydra.
▲-▲-▲ Extrakt aus 1/4 (Kopfregion); x-x-x Extrakt aus 2/4 (kopfnahe Region); o-o-o Extrakt aus 3/4 (Knospungsregion) ohne Knospenanlage; ●-●-● Extrakt aus 3/4 mit Knospenanlage; □-□-□ Extrakt aus 4/4 (Fußregion).

Die Kopfregion enthält die höchste Rohextraktaktivität mit einem Schwellenwert von 0,03 $O.D._{280}$/ml, als nächstes kommt die Zone unterhalb der Kopfregion mit 0,05 $O.D._{280}$/ml. Bei der Knospungsregion schwanken die Werte zwischen 0,04 und 0,08 $O.D._{280}$/ml, je nachdem, wie hoch der Anteil der Tiere mit nicht sichtbaren Knospenanlagen ist. Der Extrakt aus der Fußregion ist am wenigsten aktiv.

Nimmt man an, daß die den Schwellenwerten entsprechenden Konzentrationen (in O.D.) reziproke Maße für die spezifische

Aktivität der Stücke sind, läßt sich hieraus der prozentuale Anteil der Aktivität in den einzelnen Regionen berechnen (Tabelle 2).

Tabelle 2 Prozentuale Verteilung der Aktivität in einer Hydra

Region	O.D./Stück	Schwellenwert in O.D./ml	Aktivität in %
1) ohne Knospenanlage:			
1/4	0,04	0,03	45
2/4	0,04	0,05	30
3/4	0,04	0,08	20
4/4	0,02	0,15	5
2) mit Knospenanlage:			
1/4	0,04	0,03	40
2/4	0,04	0,05	25
3/4	0,04	0,04	30
4/4	0,02	0,15	5

Die Aktivität ist also nicht nur auf die Kopfregion und die Knospenanlage beschränkt. In einer Hydra ohne Knospenanlage liegt die Aktivität als Gradient vor, der von oben nach unten abnimmt. Entsteht eine Knospe, wird dieser Gradient durch eine zusätzliche Aktivität in der Knospungsregion überlagert.

Regenerationshemmung durch konzentrierten Rohextrakt

Bei der Untersuchung des Rohextrakts aus ganzen Hydren wurde festgestellt, daß bei Konzentrationen, die mehr als 10 Hydren im ml entsprechen, die Aktivität nicht weiter ansteigt und bei mehr als 15-20 Hydren im ml in Regenerationshemmung übergeht (vgl. Abb. 1). Dieser Effekt ist bei Rohextrakten aus Köpfen noch ausgeprägter. Bei der Konzentration von nur 4-5 Köpfen im ml wirkt der Rohextrakt bereits hemmend auf die Regeneration. Die Zahl der Tentakel ist in Regeneraten, die dieser Konzentration von Kopfextrakt ausgesetzt waren, höher als in der Kontrolle, die Tentakel sind jedoch kleiner, die Regenerate zeigen Vergiftungserscheinungen. Bei 12-15 Köpfen im ml ist auch die Zahl der Tentakel geringer als in der Kontrolle, bei noch höheren Konzentrationen zerfallen die Regenerate.

Diese hemmende Wirkung könnte auf der Toxizität der Nesselgifte aus den Tentakeln beruhen. Um dies zu prüfen, wurde der Rohextrakt aus Köpfen mit Tentakel mit dem aus Köpfen ohne Tentakel und mit dem aus Tentakel allein verglichen (Abb. 5). Die Aktivität des Extrakts aus Tentakel wird schon bei geringen Konzentrationen von der gegenläufigen Wirkung inhibierender Stoffe überlagert, vermutlich der Nesselgifte, die hemmend auf die Regeneration wirken. Extrakte aus Köpfen ohne Tentakel zeigen auch bei höheren Konzentrationen - soweit getestet - keine hemmende Wirkung. Die Hemmung scheint also auf die Tentakel beschränkt zu sein.

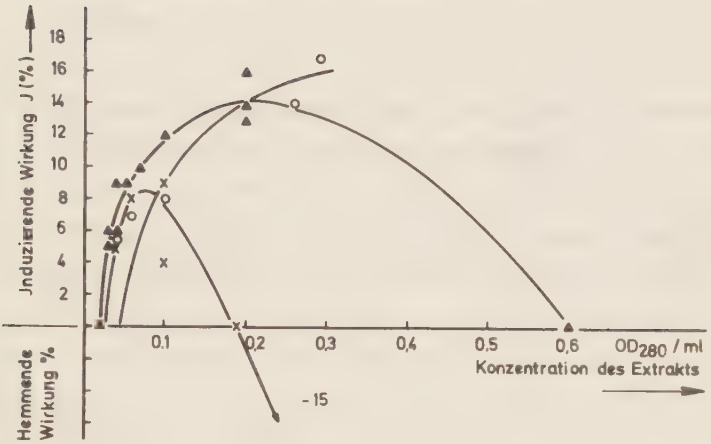


Abb. 5 Wirkung von Extrakten aus Köpfen mit und ohne Tentakel im Vergleich zu Extrakten aus Tentakel allein. ▲-▲-▲ Extrakt aus Köpfen mit Tentakel; o-o-o Extrakt aus Köpfen ohne Tentakel; x-x-x Extrakt aus Tentakel.

Aktivität des Rohextrakts bei der Regeneration eines Kopfes

Die Induktionskapazität ist in der Kopfregion höher als in jeder anderen Region der Hydra. Wie diese Anhäufung der Aktivität in der Kopfregion zustandekommt, kann man am besten bei der Regeneration eines Kopfes zeitlich verfolgen.
Es wurden zwei Serien von Regenerationsexperimenten angesetzt:

1. Schnelle Regeneration: Der Kopf wurde kurz unterhalb der Tentakel abgeschnitten. Die ersten Tentakelansätze waren schon nach 21-24 Stunden sichtbar. Nach 3 Tagen hatten die Regenerate durchschnittlich 5,9 Tentakel.

2. Langsame Regeneration: Die ganze obere Hälfte (1/4 und 2/4) wurde entfernt. Die ersten Tentakelansätze kamen nach 26-30 Stunden. Nach 3 Tagen hatten diese Regenerate durchschnittlich 5,3 Tentakel.

Die Regeneration wurde nach verschiedenen Zeiten unterbrochen. Aus den Regeneraten wurden jeweils Rohextrakte hergestellt. Die Konzentration der Rohextrakte war für alle Zeitwerte gleich und so gewählt, daß die erwartete Aktivität in den Anstiegsbereich der Konzentrationsabhängigkeit fallen sollte (vgl. Abb. 1).

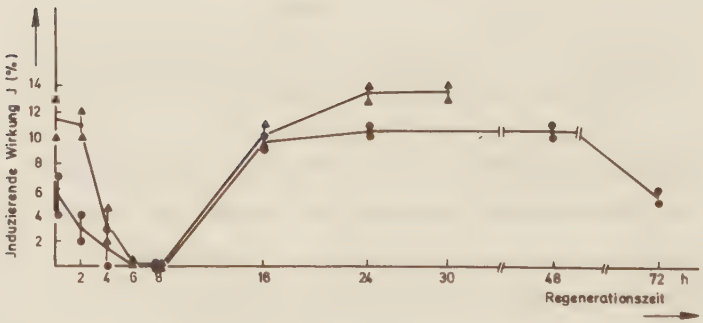


Abb. 6 Kopfregeneration: Induzierende Wirkung von Extrakten gleicher Konzentration nach verschieden langer Regenerationszeit.
▲-▲-▲ schnelle Regeneration: Extrakte aus 20 Regeneraten = 0,2 O.D./ml; ●-●-● langsame Regeneration: Extrakte aus 20 Regeneraten = 0,1 O.D./ml.

Wie Abb. 6 zeigt, nimmt in beiden Serien die Aktivität in den ersten Stunden der Regeneration stark ab. Zwischen 8 und 16 Stunden erfolgt ein Anstieg, nach 24 Stunden ist in beiden Serien ein Endwert erreicht. Der Anstieg nach 16-24 Stunden scheint unabhängig von der Zeit zu sein, die ein Tier zur Kopfregeneration braucht. Auch eine 3/4 Fußregion, die 5-6 Tage zur Regeneration des Kopfes benötigt, zeigt diesen Anstieg nach 24 Stunden. Halbiert man ein 24-Stunden-Regenerat, so stellt man fest, daß der Anstieg der Aktivität auf der höheren Konzentration des Induktors in der Region nahe der Schnittfläche beruht, aus der später der Kopf hervorgehen wird.

Für den Abfall der Aktivität in den ersten 8 Stunden sind zwei Mechanismen denkbar, interner Abbau der induzierenden Substanz oder Diffusion in das umgebende Medium. Um zwischen diesen beiden Mechanismen zu entscheiden, wurde zunächst das umgebende Medium von Regeneraten auf induzierende Aktivität untersucht. In 10 ml Medium regenerierten 50 Tiere. Diese Konzentration sollte induzierend wirken, falls ein großer Teil der Aktivität durch die Schnittfläche in das Medium diffundierte. Es konnte keine Aktivität im Medium nachgewiesen werden. Wenn der Abfall der Aktivität bei der Kopfregeneration auf Diffusion durch die Schnittfläche beruht, sollte man ihn auch bei der Regeneration eines Fußes messen können. Eine Hydra wurde halbiert, die obere Hälfte (1/4 und 2/4) wurde zur Regeneration des Fußteils benutzt. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 7 dargestellt.

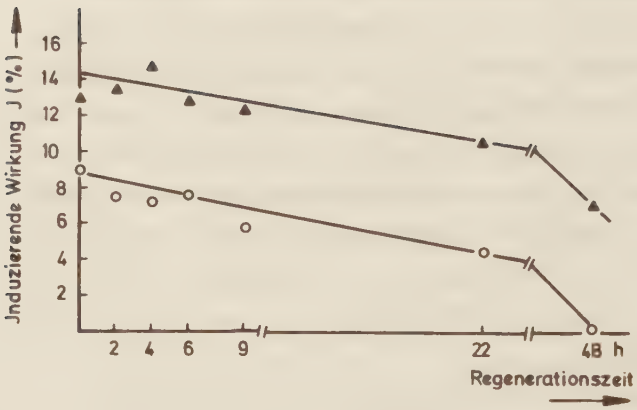


Abb. 7 Fußregeneration: Induzierende Wirkung von Extrakten gleicher Konzentration nach verschieden langer Regenerationszeit.
▲-▲-▲ Extrakt aus 20 Stücken = 0,2 O.D./ml;
o-o-o Extrakt aus 10 Stücken = 0,1 O.D./ml.

Der Befund ist negativ. Bei der Fußregeneration gibt es kein Absinken der Aktivität in den ersten 8 Stunden und auch keinen Anstieg der Aktivität nach 24 Stunden.
Diffusion der induzierenden Substanz durch die Schnittstelle in das umgebende Medium kann also als Erklärung für den Abfall der Aktivität bei der Kopfregeneration ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist, daß die induzierende Substanz für die Regeneration der Kopfregion spezifisch abgebaut wird.

Korrelation der Aktivität des Rohextrakts mit dem Auftreten bestimmter Zellarten

Die induzierende Aktivität ist in der Kopfregion stärker konzentriert als im restlichen Tier. Ein zweites Aktivitätszentrum entsteht bei der Induktion der Knospe. In Kopfregeneraten ist 24 Stunden nach Beginn der Regeneration ein starker Anstieg in der Aktivität festzustellen. Lassen sich diese Anhäufungen der Aktivität mit der Konzentration bestimmter Zellarten korrelieren?

Eine ausgewachsene Hydra besteht nach Abschneiden der Tentakel und der Knospen aus etwa 100 000 Zellen. Die Tentakel enthalten weitere 30 000 Zellen, davon sind mehr als 95% Cnidien. Solche Hydren wurden in sechs Teile geschnitten. Für jede dieser 6 Regionen wurde 1. die Zahl der Zellen und 2. das Verhältnis der verschiedenen Zellsorten zueinander bestimmt. Die Zellverteilung ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Pro Region wurden etwa 4000 Zellen ausgezählt. (Diese und auch die folgenden Zellzählungen wurden als Gemeinschaftsarbeit von der am Hydraprojekt arbeitenden Gruppe durchgeführt).

Auf Grund der Zellverteilung kommen nur 2 Zellsorten für eine Korrelation mit der Aktivität in Frage: die Munddrüsenzellen und die Nervenzellen. Die Munddrüsenzellen sind ausschließlich auf die Kopfregion beschränkt. Falls sie für die induzierende Aktivität verantwortlich sind, müßte man sich den Gradienten durch eine diffusible Substanz gebildet vorstellen, die in der Kopfregion produziert wird und von da

in den restlichen Körper diffundiert. Bei den Nervenzellen hat man diese Schwierigkeit nicht. Ihre Verteilung stimmt besser mit den gefundenen Aktivitäten überein: Ein Drittel aller Nervenzellen des Tieres (1500) sind in der Kopfregion, die nur 8% aller Zellen enthält, konzentriert. 45% der Nervenzellen sind über die mittlere Region verteilt (750 in A, 600 in B, 450 in der Knospungsregion). Die restlichen 20% (750) sind in der Fußregion konzentriert. (Der Extrakt aus der Fußregion enthielt keine oder wenig induzierende Aktivität).

Um zwischen den Munddrüsenzellen und den Nervenzellen als Produzenten der induzierenden Aktivität zu entscheiden, wurde noch die Verteilung der Zellen bei der Knospeninduktion untersucht. Eine Scheibe mit einer Andeutung einer Knospe wurde aus der Knospungsregion herausgeschnitten. Diese Scheibe wurde in eine Hälfte mit und ohne Knospe geteilt und jede Hälfte, die jeweils aus etwa 15 000 Zellen bestand, auf ihre Zellzusammensetzung geprüft. Außerdem wurde versucht, den Knospenanlagenbereich allein herauszuschneiden. Er enthielt etwa 5 000 Zellen. Die Zellverteilung ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

Die einzige Zellsorte, die im aktiven Bereich besonders angereichert vorkommt, sind die Nervenzellen. Die Scheibenhälfte mit der Knospenanlage hat fast doppelt soviel Nervenzellen wie die komplementäre Hälfte ohne Anlage, die Knospenanlage selbst hat fast dreimal soviel. Insgesamt sind

Tabelle 3 : Prozentuale Verteilung der Zellsorten innerhalb der einzelnen Regionen

Region	Kopf	A	B	Kn.	P	F
Zellzahl pro Region	7 000	23 000	29 000	24 000	6 000	1 500
Epithelzellen (Ekto-und Endo-)	28	21	19	23	25	58
große interstitielle Z.	6	20	22	20	15	4
kleine i-Zellen	3	25	25	25	23	4
Nematocyten	6	21	22	21	20	5
Cnidien	5	5	5	5	8	6
Nervenzellen	19	3	2	2	7	23
Drüsenzellen	-	4	5	4	2	-
Münddrüsenzellen	33	1	-	-	-	-

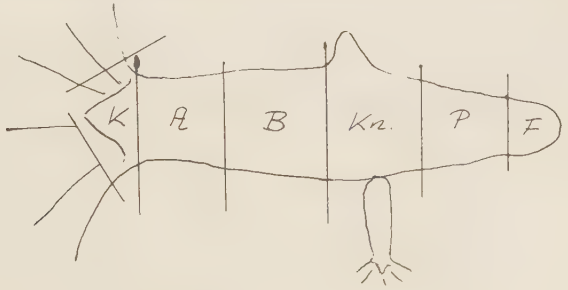


Tabelle 4 Prozentuale Verteilung der Zellen in einer Knospenanlage

	Scheiben-hälfte ohne Knospen-anlage	Scheiben-hälfte mit Knospen-anlage	Knospen-anlage allein
Epithelzellen	18	18,5	20
große i-Zellen	20	22	20
kleine i-Zellen	27	27	21
Nematocyten	28	24	25
Cnidien	3	3	5
Nervenzellen	1,5	2,7	4
Drüsenzellen	3,5	3	4
Munddrüsenzellen	-	-	-

15 000 Zellen

15 000 Zellen

5000 Zellen

in der Knospenanlage 150-200 zusätzliche Nervenzellen. Bei allen anderen Zellarten gibt es keine starken Variationen. Die Munddrüsenzellen kommen in der Knospenanlage nicht vor. Da auch bei der Kopfregeneration das Auftreten der Munddrüsenzellen mit dem Anstieg der Aktivität zeitlich nicht korreliert ist, kann man die Munddrüsenzellen als Produzenten der Aktivität ausschließen und die folgende Diskussion auf die Nervenzellen beschränken.

Bei der Regeneration eines Kopfes kann man mit dem Ansteigen der Aktivität auch eine Zunahme in der Konzentration der Nervenzellen messen (Tabelle 5).

Tabelle 5 Anstieg der Konzentration der Nervenzellen mit zunehmender Regenerationszeit

Regenerationszeit in Stunden	Schnelle Regeneration Nervenzellen		Langsame Regeneration Nervenzellen	
	%	Zahl	%	Zahl
0	3	270	2	300
12	3	250	nicht gemessen	
17	nicht gemessen		3	450
24	7	600	4	600
36	10		4	
48	12		10	

Nach 24 Stunden Regenerationszeit war in beiden Versuchen die Zahl der Nervenzellen auf das Doppelte angestiegen. Dieser erste Anstieg in der Konzentration der Nervenzellen ist, wie auch die Aktivität des Rohextrakts (vgl. Abb. 6), unabhängig von der Zeit, die ein Tier für die Regeneration des Kopfes braucht. Der zweite Anstieg in der Konzentration der Nervenzellen erfolgte bei schneller Regeneration nach 36 Stunden, bei langsamer nach 48 Stunden. Dieser zweite Anstieg ist anscheinend abhängig von der Regenerationszeit, er ist mit dem Erscheinen der ersten Tentakel korreliert.

Alle durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die Konzentration an induzierender Aktivität in Rohextrakten mit der Konzentration von Nervenzellen in den verschiedenen Regionen positiv korreliert ist. Man kann diese Korrelation auch quantitativ erfassen. Berechnet man, wieviele Nervenzellen pro ml einer Extraktaktivität entsprechen, die die Tentakelzahl um 5% erhöht, so kommt man zu folgenden Zahlen (Tabelle 6).

Tabelle 6 Berechnung der Zahl der Nervenzellen pro ml, deren Extrakt nötig ist, um den Schwelleneffekt zu erzielen.

Bezeichnung der Region	O.D.$_{280}$/ Region	Nervenzellen/ Region	Schwellenwert O.D./ml	Schwellenwert Nervenzellen/ ml
1/4 Kopfregion	0,04-0,05	1000	0,03	600-750
2/4 kopfnahe Region	0,04-0,05	600	0,05	600-750
3/4 Knospungsregion ohne Anlage	0,04-0,05	400	0,08	600-800
3/4 Knospungsregion mit Anlage	0,04-0,05	400 + 200	0,04	500-600
4/4 Fußregion	0,02-0,03	600	0,15	3000-4500

Für die verschiedenen Regionen (außer der Fußregion) findet man, daß der Extrakt aus 500-1000 Nervenzellen im ml genügt, um eine Steigerung der Tentakelzahl um 5% zu erreichen.

Anreicherung von Nervenzellen durch Zelltrennung und Korrelation mit der induzierenden Aktivität

Die Korrelation von Zellverteilung und Aktivität macht es wahrscheinlich, daß die Nervenzellen die Produzenten der induzierenden Substanz sind. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde versucht, die Nervenzellen durch Zelltrennung anzureichern.

Die üblichen Zelltrennungsverfahren für lebende Zellen erwiesen sich als ungeeignet, da durch Trypsinbehandlung oder andere Methoden der Gewebezerlegung die Nervenzellen ihre Fortsätze verlieren und morphologisch nicht mehr von anderen kleinen Zellen zu unterscheiden sind. Deshalb wurden macerierte Zellen als Ausgangsmaterial für eine Zelltrennung benutzt. Dies scheint gerechtfertigt, da derartige Zellen noch 70-80% der ursprünglich in lebenden Hydren vorhandenen Aktivität enthalten. Nach Trennung der Zellen in einem diskontinuierlichen Glycerin- oder Saccharosegradienten erhält man folgende Verteilung der Zellen in den verschiedenen Banden (Tabelle 7).

Tabelle 7 Prozentuale Verteilung von Zellen innerhalb verschiedener Fraktionen

Fraktion	Nervenzellen	kleine Zellen +)	große Zellen ++)	Sonstiges
ungetrenntes Zellgemisch	4-6	65-75	20-30	Debris, Gewebe
Bande 1	40-60	5-20	20-40	Debris
Bande 2	25-30	15-30	40-60	Kerne, Debris
Bande 3	5	40-60	30-50	
Bande 4	2	50-70	10-30	Gewebe
Bande 5	5	70-80	20	Gewebe, Tentakel

+) Als kleine Zellen wurden Nematocyten, Cnidien und interstitielle Zellen gezählt.

++) Zu den großen Zellen gehörten Epithelzellen, Drüsenzellen und Munddrüsenzellen.

Bande 1 (die oberste Bande des Gradienten) besteht zu 50% aus Nervenzellen, Bande 2 zu 25-30%. Da das ungetrennte Zellgemisch nur 4-6% Nervenzellen enthält, entspricht dies einer 10-fachen Anreicherung der Nervenzellen in Bande 1, einer etwa 5-fachen in Bande 2. Für das ungetrennte Zellgemisch und die verschiedenen Banden wurden die in Abb. 8 dargestellten Aktivitäten ermittelt.

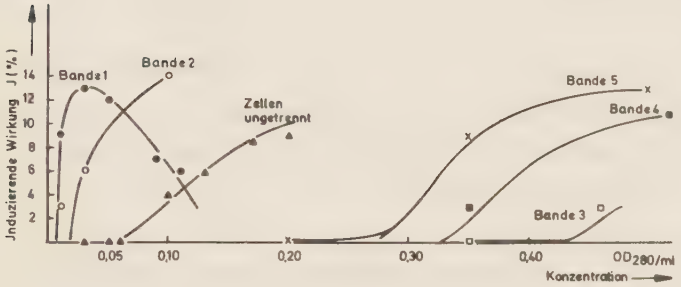


Abb. 8 Induzierende Wirkung von Extrakten aus den verschiedenen Zellbanden

Der Anreicherung von Nervenzellen entspricht auch eine Anreicherung der Aktivität. Gegenüber dem ungetrennten Zellgemisch hat Bande 1 eine 15-20-fach höhere spezifische Aktivität (bezogen auf O.D.), Bande 2 ist etwa fünfmal aktiver. Alle anderen Banden enthalten weniger Aktivität als die ungetrennten Zellen. Auch gegenüber dem Rohextrakt

aus Hydren ist die Aktivität in Bande 1 15-fach angereichert. Eine Steigerung der Tentakelzahl um 10% (1 BU) wird mit Rohextrakt bei einer Konzentration von 0,15 O.D./ml erreicht, mit dem Extrakt aus Bande 1 mit 0,01 O.D./ml. Dieser Versuch bestätigt die Annahme, daß die Nervenzellen die induzierende Aktivität enthalten.

Lokalisation der induzierenden Substanz in strukturgebundener Form

Bei den für die Zelltrennung benutzten Macerationsbedingungen diffundieren alle löslichen Komponenten aus den Zellen heraus. Die macerierten Zellen enthalten jedoch noch 70-80% der ursprünglichen Aktivität. Daraus kann man schließen, daß die induzierende Aktivität zum größeren Teil strukturgebunden und nur ein kleiner Rest frei diffusibel ist. An welche Struktur ist die Aktivität gebunden?
Um diese Frage zu klären, wurden Hydren unter möglichst schonenden, iso-osmolaren Bedingungen homogenisiert und das Homogenat einer differentiellen Zentrifugation unterworfen. Die Aktivität verteilte sich,wie in Tabelle 8 gezeigt,auf die verschiedenen Fraktionen.

In den drei Sedimenten sind 60-70% der Masse und fast 90% der Aktivität. Dieser Versuch bestätigt den Befund mit macerierten Zellen: der größte Teil der Aktivität ist in Hydra strukturgebunden, nur wenig ist frei diffusibel.

Etwa die Hälfte der gesamten Aktivität ist im 3 000 g Sediment, d.h. an größere Strukturen, eventuell an Nervenenden,

Tabelle 8 Verteilung der Aktivität nach differentieller Zentrifugation in iso-osmolarem Puffer ohne Detergentien

Fraktion	Verteilung der O.D.in %	Verteilung der Aktivität in %	Charakterisierung der Fraktion
3 000 g Sed.	60-80	40-60	Kerne, Nesselkapseln, Zellwände, Nervenenden
10 000 g Sed.	5-10	0-20	Mitochondrien, große Mikrosomen
35 000 g Sed.	5-10	20-30	kleine Mikrosomen, Vessikel, Partikel etc.
35 000 g Überstand	10-20	10-30	lösliche Zellbestandteile

gebunden. Durch Behandlung mit Triton-X-100 und EDTA kann man einen großen Teil der Aktivität von diesen größeren Strukturen ablösen. Homogenisiert man die Zellen mit 0,1 - 0,5% Triton-X-100 und 10^{-2} M EDTA im Homogenisationspuffer, so kommt man zu folgender veränderter Verteilung der Aktivität bei differentieller Zentrifugation (Tabelle 9).

Tabelle 9 Verteilung der Aktivität nach Homogenisation mit Triton-X-100 und EDTA im Puffer und anschließender Zentrifugation

Fraktion	Verteilung der $O.D._{280}$ in %	Verteilung der Aktivität in %
3 000 g Sed.	30-50	10-20
10 000 g Sed.	5-10	0-10
35 000 g Sed.	10-25	40-50
35 000 g Überstand	10-30	10-30

Bis zu 50% der Aktivität sind nach Behandlung mit Triton-X-100 und EDTA im 35 000 g Sediment, d.h. in einer Fraktion, die vorwiegend Mikrosomen enthält. Die Aktivität ist in dieser Fraktion 2-5-fach gegenüber dem Rohextrakt angereichert.

In Anlehnung an bekannte Methoden zur Isolierung von neurosekretorischen Vessikeln (Stusinsky, 1967) wurde versucht, diese Mikrosomenfraktion weiter aufzutrennen. Als erster Schritt wurde eine präparative Dichtezentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten (30, 40 und 60% Saccharose) durchgeführt. Die induzierende Aktivität, d.h. die Struktur, an die sie gebunden ist, bleibt auf Grund ihrer Dichte in der Bande, der 30% Saccharose entsprechen. Diese Bande enthält nur 10% der eingesetzten O.D., aber 80% der Aktivität. Dieser Schritt bringt eine 10-fache Reinigung bei etwa 80% Ausbeute.

Nach Konzentration durch Rezentrifugation in verdünnter isoosmolarer Saccharose wurde diese Bande einer zweiten Dichtezentrifugation zum Gleichgewicht in einem kontinuierlichen 20-30% Saccharosegradienten unterworfen, um die Dichte der Struktur zu bestimmen, an die die induzierende Substanz gebunden ist. Die Aktivität verteilt sich wie in Abb. 9 gezeigt auf die verschiedenen Fraktionen.

Mehr als 90% der Aktivität wird in einem Bereich wiedergefunden, dem 21-23% Saccharose entsprechen. Da in dieser Bande nur 10-15% der eingesetzten O.D. zu finden sind, erreicht man

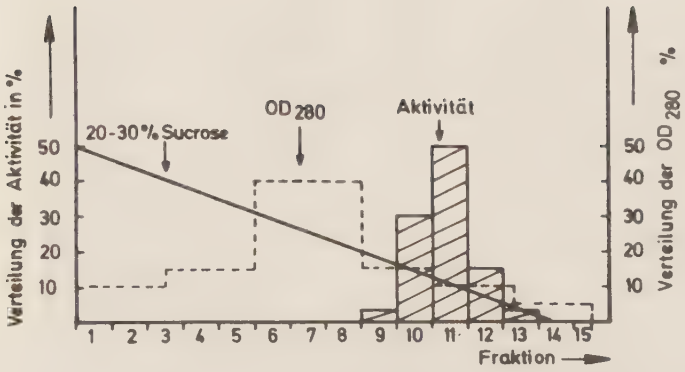


Abb. 9 Verteilung der Aktivität im 20-30% kontinuierlichen Saccharosegradienten

in diesem Schritt wiederum eine 10-fache Anreicherung bei etwa 90% Ausbeute. Der Mittelpunkt des Aktivitätspeaks liegt bei etwa 22% Saccharose, woraus man zu einer Dichte von etwa 1,09 kommt. Diese Dichte von 1,09 spricht für einen hohen Lipidanteil, der vor allem für membranöse Strukturen aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum charakteristisch ist.

Eine elektronenmikroskopische Aufnahme der aktiven Fraktion zeigt (Abb. 10), daß bei der Dichte von 1,09 Strukturen verschiedener Größe banden. Es wurde versucht, diese Strukturen weiter aufzutrennen. Vorläufige Befunde weisen darauf hin, daß die Aktivität in einer Fraktion angereichert werden kann, die vorwiegend Partikel von 300-600 Å Durchmesser enthält.

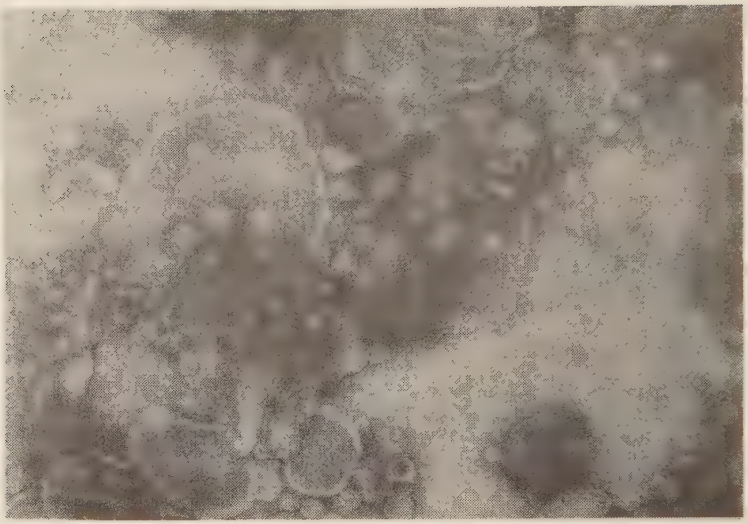


Abb. 10 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Fraktion 11 aus dem 20-30% Saccharosegradienten. Vergrößerung: 126 000 x.

Strukturgebundene niedermolekulare Komponente

70-90% der Aktivität sind strukturgebunden, davon zu mehr als der Hälfte an membranöse Partikel. Man könnte dies so interpretieren, daß diese Partikel als Speicher für eine diffusible Substanz dienen, die je nach Bedarf entladen werden können. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, daß der größere Teil der aktiven Substanz an Membranen gebunden ist, aber mit frei diffusibler Substanz im Gleichgewicht steht. Falls derartige Konzepte zutreffen, sollte man aus den Partikeln als aktive Komponente eine niedermolekulare Substanz herauslösen können.

Folgende Methoden eignen sich zur Freisetzung der aktiven Substanz:

1. mehrmaliges Einfrieren und Auftauen, 2. osmotischer Schock, 3. Ultraschallbehandlung, 4. Dialyse der Partikel gegen verdünnten Puffer.

Nach jeder dieser Behandlungen kann man 70-90% der Aktivität als niedermolekulare Komponente nachweisen.

Reinigung der niedermolekularen Substanz

Zur Isolierung und Charakterisierung der niedermolekularen Komponente wurde versucht, möglichst alle Aktivität in die diffusible Form überzuführen. Um dies zu erreichen, wurden Hydren in verdünntem Puffer oder in dest. Wasser mit Ultraschall behandelt. Nach einer Zentrifugation von 60 min. bei 35 000 g findet man nur noch 5-10% der Aktivität im Sediment, fast alle Aktivität ist im Überstand.

Die verschiedenen Schritte zur Isolierung der induzierenden Substanz sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Für jeden Schritt wurde die Aktivität der verschiedenen Fraktionen bestimmt.

Diese Reinigungsmethode bringt, bezogen auf die optische Dichte, eine mehr als 350 000-fache Anreicherung der induzierenden Aktivität bei etwa 40% Ausbeute.

Dies ist in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 10 Reinigung der niedermolekularen Substanz

1. Schritt: Homogenisation in verdünntem Puffer, 5 min. Ultraschallbehandlung (Rohextrakt).

2. Schritt: Der Rohextrakt wird auf eine Endkonzentration von 0,25% Essigsäure gebracht und 60 min. bei 35 000 g zentrifugiert (Essigsäureüberstand).

3. Schritt: Der Essigsäureüberstand wird mit Ammoniak auf pH 7 eingestellt, nach Eindampfen im Rotationsverdampfer auf eine Bio-Gel P-2 Säule aufgetragen und fraktioniert. Die Aktivität wurde in Fraktion 30-37 nachgewiesen (P-2 Fraktion), Abb. 11a.

4. Schritt: Die P-2 Fraktion wird eingedampft und auf einer oder zwei kleineren P-2 Säulen konzentriert. Die Aktivität eluiert in Fraktion 12-15 (P-2 Fraktion konz.), Abb. 11b.

5. Schritt: Die P-2 Fraktionen (12-15) werden eingedampft und auf einer G-10 Säule mit 0,01 M NaCl, 0,01 M Tris Cl, pH 7,4, als Elutionsmittel chromatographiert (G-10 Fraktion), Abb. 11c.

6. Schritt: Die aktiven G-10 Fraktionen (17-22) werden eingedampft und zum Entsalzen auf einer zweiten G-10 Säule mit dest. Wasser als Elutionsmittel chromatographiert (G-10 Fraktion dest.), Abb. 11d.

7. Schritt: Die aktiven G-10 Fraktionen (13-17) werden auf eine DEAE-A 25-Säule aufgetragen, die mit 0,01 M Tris Cl, pH 7,4, äquilibriert ist. Elution in Stufen: 0,1 und 0,5 M NaCl. Die Aktivität kommt mit 0,5 M NaCl von der Säule.

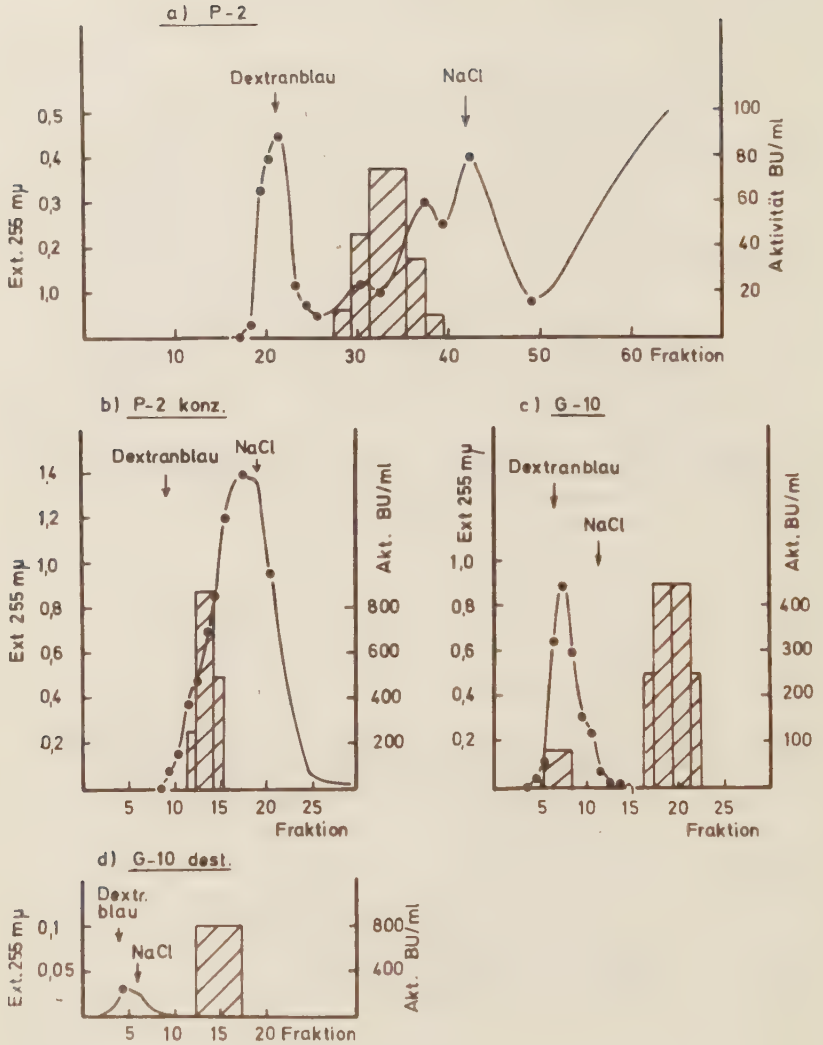


Abb. 11 Reinigung der niedermolekularen Substanz

a. Chromatographie des Essigsäureüberstandes auf P-2, Puffer C. Fraktionen je 11,5 ml. V_t = 660 ml, R_F = 0,62. b. Konzentration von Fraktion 30-37 aus 11a auf P-2. Fraktionen je 1,9 ml, Puffer C. V_t = 40 ml, R_F = 0,62. c. Chromatographie von Fraktion 12-15 aus 11b auf Sephadex G-10, Puffer C. Fraktionen je 1,9 ml. V_t = 25 ml, R_F = 0,3, K_d = 3,1. d. Entsalzen von Fraktion 17-22 aus 11c auf Sephadex G-10 mit dest.Wasser als Elutionsmittel. Fraktionen je 0,95 ml. V_t = 5 ml, R_F = 0,27, K_d = 5,5.

Tabelle 11 Beispiel für Ausbeute und Anreicherung bei einer Aufarbeitung von 60 ml Hydren (= 9 000 $O.D._{280}$ = 3 g Protein)

Fraktion	Masse $O.D._{280}$	Aktivität BU	BU/O.D.	Ausbeute %	Reinigung x-fach
Rohextrakt	9 000	6 000	0,7	100	
Essigsäureüberstand	925	5 400	6	90	9
P-2 Fraktion	240	5 000	20	80	30
P-2 Fraktion konz.	32	4 700	150	75	200
G-10 Fraktion	0,2	4 000	20 000	65	30 000
G-10 Fraktion dest.	0,05	3 000	60 000	55	90 000
(P-2 Fraktion konz.	0,02	2 500	125 000	40	180 000)
DEAE Fraktion	< 0,01	2 500	> 250 000	40	> 350 000

Mit der Essigsäurebehandlung fällt man 90% des Materials aus, die aktive Komponente bleibt löslich. Dies führt zu einer 10-fachen Reinigung. Die Gelfiltration auf P-2 trennt alle Moleküle ab, die größer als 150 und kleiner als 1000 sind. Dieser Schritt bringt eine 20-fache Reinigung. Durch Chromatographie auf Sephadex G-10 behält man nur noch jene Moleküle zurück, die ein gleiches Adsorptionsverhalten wie die aktive Komponente zeigen, d.h. die erstens in der Größe ähnlich sind und zweitens auf Grund aromatischer Ringe gleich stark adsorbieren. Dieser Schritt ist sehr effektiv und führt zu einer 500-fachen Anreicherung. Durch Rechromatographie mit diesen beiden Säulentypen - gleich in welcher Reihenfolge - kommt man zu einer fast 200 000-fachen Reinigung. Als letzter Schritt wurde eine DEAE-Säule benutzt, von der die induzierende Substanz bei 0,3-0,4 M NaCl im kontinuierlichen Salzgradienten abgelöst wird (oder mit 0,5 M NaCl im Stufengradienten).

Bei der in Tabelle 11 beschriebenen Aufarbeitung wurde von 3 g Protein ausgegangen. Im letzten Schritt konnten keine $O.D._{280}$ nachgewiesen werden, d.h. man behält weniger als 0,01 $O.D._{280}$ zurück, was weniger als 1-10 γ Protein entspricht. Mit dieser Rechnung kommt man zu einer insgesamt 300 000- bis 3 000 000-fachen Reinigung.

Charakterisierung der niedermolekularen Substanz

1. Molekulargewicht

Die Größe des Moleküls wurde durch folgende Methoden abgeschätzt:

a) Chromatographie auf Bio-Gel und Sephadex: Beide Gele trennen Moleküle nach Molekulargewicht. Auf Bio-Gel P-2 hat die induzierende Substanz einen R_F von 0,62. Diesem R_F von 0,62 entspricht ein Molekulargewicht von etwa 300. (Reduziertes Glutathion mit einem Molekulargewicht von 307 kommt mit einem R_F von 0,62 von der Säule). Aus dem Verhalten auf Sephadex kann man andererseits schließen, daß die induzierende Substanz stark adsorbierende Gruppen enthält. Bei stärker vernetzten Gelen spielen neben Molekülsiebeffekten auch Adsorptionseigenschaften eine Rolle - stärker bei Sephadex, schwächer bei Bio-Gel. Aus dem R_F von 0,62 kann man also nur abschätzen, daß das Molekulargewicht der induzierenden Substanz größer als 300, aber nicht um Größenordnungen davon verschieden ist.

b) Bestimmung der Größe durch Diaflo-Ultrafilter: Das Diaflo-Ultra-Filtriergerät ist mit Membranen ausgestattet, die wie bei der Dialyse nur Moleküle unter einer bestimmten Größe durchlassen. Für die Abschätzung des Molekulargewichts der induzierenden Substanz wurden folgende Membranen auf ihre Durchlässigkeit untersucht: UM-10 mit einer Trenngrenze beim Molekulargewicht von 10 000, UM-2 mit einer Trenngrenze bei 1 000 und UM-05 mit einer Trenngrenze bei 500. Bei der UM-10 Membran geht alle Aktivität durch das Filter, bei der UM-2 Membran werden 90-95% der Aktivität zurückgehalten, etwa 1-5% können im Außendialysat nachgewiesen werden. Bei der UM-05 Membran bleibt

alle Aktivität innen. Aus diesem Verhalten kann man schließen, daß die induzierende Substanz größer als 500 ist. Die geringe Durchlässigkeit bei der UM-2 Membran deutet darauf hin, daß das Molekulargewicht etwa 1 000 ist.

c) Molekulargewichtsbestimmung durch Sedimentations-Gleichgewichts-Zentrifugation: Wenn man Moleküle bei einer Geschwindigkeit zentrifugiert, bei der sie nicht auf den Boden sedimentieren, stellt sich je nach Molekulargewicht und Rotationsgeschwindigkeit ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion ein. Bei gegebener Dichte und Zentrifugalbeschleunigung läßt sich aus dem Konzentrationsgradienten das Molekulargewicht errechnen.

Für die Bestimmung des Konzentrationsgradienten wurden in Versuch A 500 BU und in Versuch B 1000 BU der gereinigten Substanz 8 Tage lang bei 60 000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde die Aktivität für die verschiedenen Banden bestimmt. In beiden Versuchen wurden 5 gleich große Fraktionen von je 0,4 ml ausgetropft.
Im Gradienten A, in dem 500 BU eingesetzt waren, wurde für verschiedene Banden die Flüssigkeitsmenge bestimmt, die einer biologischen Einheit entspricht:

Fraktion	1 BU (λ)	BU/Bande	BU/ml
Bande 1	1	400	1 000
Bande 3	20	20	50
Bande 4 und 5	> 50	< 8	< 20

Die Aktivität von 1 BU wurde in der untersten Bande (Bande 1) mit 1 λ erreicht, in Bande 3 mit 20 λ , in Bande 4 und 5 ergaben auch 50 λ noch nicht 1 BU. Es ergibt sich ein Konzentrationsgefälle zwischen Bande 1 und 3 um den Faktor 20.

Um auch die Konzentration in der oberen Bande zu bestimmen, wurden aus Gradient B mit 1 000 BU Gesamtaktivität die Schwellenwerte ermittelt:

Fraktion	Flüssigkeitsmenge für Schwellenwert (λ)	Aktivität/ Bande	Aktivität/ ml
Bande 1	0,2	2 000	5 000
Bande 2	1	400	1 000
Bande 3	5	80	200
Bande 5	50	8	20

Den gleichen Effekt gaben 0,2 λ der Bande 1, 1 λ der Bande 2, 5 λ der Bande 3 und 50 λ der Bande 5. Zwischen Bande 1 und 5 hat man ein Konzentrationsgefälle von 1:250.

Trägt man für jede Bande die Konzentration der induzierenden Substanz (als BU/ml) logarithmisch gegen die Entfernung vom Rotationsmittelpunkt auf, so sollte man zu einer Geraden kommen.

Abb. 12 zeigt, daß die vier Meßwerte für die Schwellenwerte aus Gradient B annähernd auf einer Geraden liegen. Trägt man auch die für den Gradienten A ermittelten Werte der BU für Bande 1 und 3 ein, sieht man, daß die durch

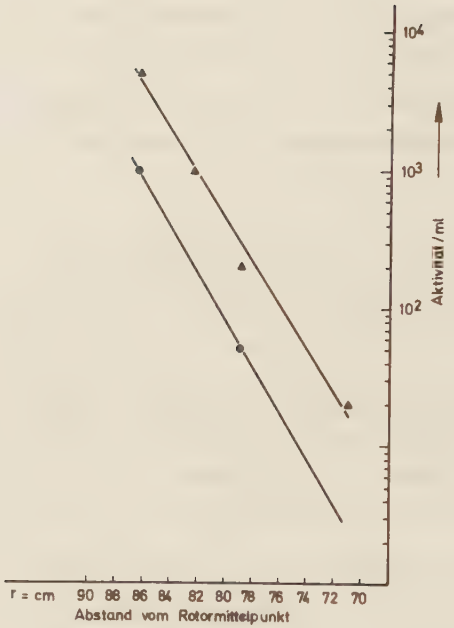


Abb. 12

diese beiden Punkte definierte Gerade etwa die gleiche Steigung hat, wie die Gerade für den Gradienten B. Diese Steigung ist proportional dem Molekulargewicht der aktiven Substanz. Aus dem Konzentrationsgefälle von 250 zwischen Bande 1 und 5 bzw. von 20 zwischen 1 und 3 kann man nach folgender Formel die Molekulargewichte errechnen:

$$MW = \frac{\ln \frac{c_1}{c_2} \times k \times T \times N}{(1-\bar{v}\rho) \times \omega^2 \times \frac{r_1^2 - r_2^2}{2}}$$

wobei $\frac{c_1}{c_2}$ das Konzentrationsgefälle ist, d.h. in Versuch A 20, in B 250; k ist die Boltzmann-Konstante (= $1{,}36 \times 10^{-16}$), T die absolute Temperatur, N die Lochschmidtsche Zahl (= 6×10^{23}), $\bar{v}$ das partielle spez. Volumen (= 0,7 - 0,75 für Peptide), ρ die Dichte des Lösungsmittels (= 1), ω die Winkelgeschwindigkeit (= 0,105 × UpM) und r der Abstand vom Rotationsmittelpunkt.

Gradient A $\frac{c_1}{c_3} = 20$ $r_1 = 8{,}65$ cm, $r_3 = 7{,}9$ cm

$$MW = \frac{\ln 20 \times 1{,}38 \times 10^{-16} \times 278 \times 6 \times 10^{23}}{0{,}30 \times 39{,}69 \times 10^{6} \times 6{,}2} = 940 \ (\bar{v} = 0{,}70$$

$$= 1120 \ (\bar{v} = 0{,}75)$$

Gradient B $\frac{c_1}{c_5} = 250$ $r_1 = 8{,}65$ cm, $r_5 = 7{,}1$ cm

$$MW = \frac{\ln 250 \times 1{,}38 \times 10^{-16} \times 278 \times 6 \times 10^{23}}{0{,}25 \times 39{,}69 \times 10^{6} \times 12{,}2} = 1050 \ (\bar{v} = 0{,}75)$$

$$= 885 \ (\bar{v} = 0{,}70)$$

Je nachdem, welchen Wert man für das spezifische Volumen einsetzt, ergibt sich aus dem Gleichgewichtslauf ein Molekulargewicht von 900 bis 1100.

In Übereinstimmung mit der Diaflo-Methode erhält man mit dieser Messung einen Wert von etwa 1000 als Größe für die induzierende Substanz.

2. Peptidnatur der induzierenden Substanz

Um etwas über die Natur der induzierenden Substanz aussagen zu können, wurden verschiedene Enzyme auf ihre aktivitätszerstörende Wirkung untersucht. Keinen Effekt auf die induzierende Wirkung hatten DNase (10 γ/ml), RNase (10 γ/ml), Lipase (100 γ/ml) und Hyaluronidase (100 γ/ml). Das Molekül enthält weder DNS noch RNS als aktive Komponente. Es ist kein Fett und wahrscheinlich kein Mucopolysaccharid.

Die induzierende Wirkung wird zerstört durch Behandlung mit Peptidasen. Untersucht wurden die beiden Enzyme Pronase und Trypsin. Beide zerstörten die Aktivität. Ein Beispiel für einen Abbau der Aktivität durch Pronase ist in Tabelle 12 angeführt.

Um die Wirkung von Pronase zu untersuchen, wurde 1 BU der gereinigten induzierenden Substanz (DEAE-Fraktion) mit 170 γ/ml Pronase 6 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge Substanz ohne Pronase und die Pronase ohne Substanz mitinkubiert und später auf ihre Aktivität getestet. Für die drei Proben ergaben sich die in Tabelle 12 wiedergegebenen Aktivitäten. Die induzierende Substanz erhöht die Tentakelzahl pro Tier um mehr als eine Tentakel. Die 6-stündige Inkubation bei 37°C ohne Pronase zerstört die Aktivität nicht. Andererseits genügen 6 Stunden Inkubation, um Pronase sich selbst so weit abbauen zu lassen, daß sie nicht mehr störend im Test wirkt (1 γ/ml Pronase ohne Vorinkubation wirkt stimulierend auf die Ten-

Tabelle 12 Abbau der Aktivität durch Pronase

	regenerierter Kopf			Knospen		Reg. mit Kopf und Knospe	
	Zahl der Regenerate	mittlere Tent.zahl	I (%)	Zahl/ Reg.	mittlere Tent.zahl	mittlere Tent.-Zahl pro Tier	I (%)
Kontrolle	85	5,67	-	0,71	3,58	8,20	-
1 BU induz. Substanz (DEAE-Fraktion)	82	6,22	10	0,85	3,74	9,44	15
170 γ/ml Pronase = 0,86γ im Test	84	5,89	4	0, 67	3,25	8.15	-
1 BU induz. Substanz 6 Stunden inkubiert mit 170γ/ml Pronase	84	5,81	3	0,74	3,48	8,33	1,5

takelzahl des Kopfes). Die mit Pronase inkubierte induzierende Substanz hat ihre induzierende Wirkung verloren. Dieser Versuch wurde mehrmals wiederholt. In jedem Fall zerstörte Pronase die Aktivität.

3. Weitere Eigenschaften

Die induzierende Substanz ist hitzestabil (10 min. 100°C). Einfrieren schadet nicht. 0,1 N Natronlauge zerstört die Aktivität. Keinen Effekt haben 8 M Guanidinhydrochlorid und 8 M Harnstoff. 10^{-3} M β-Mercaptoäthanol scheint zu labilisieren.

Alle diese Eigenschaften stehen im Einklang mit der Annahme, daß es sich um ein Peptid mit 8-10 Aminosäuren handelt. Die starke Adsorption an Sephadex G-10 läßt auf das Vorhandensein einer oder mehrerer aromatischer Aminosäuren schließen, die stärkere Retardierung auf G-10 mit dest. Wasser als Elutionsmittel anstelle von 0,1 M NaCl weist auf eine basische Gruppe hin. Das Verhalten auf DEAE läßt sich durch eine saure Gruppe erklären, die Labilität gegenüber SH-Reagenzien durch eine SH-Gruppe. Das Molekül enthält also vermutlich stark polare Gruppen.

Wirkungsweise der gereinigten Substanz auf Regeneration und Knospung

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, wirkt die gereinigte Substanz sowohl auf die Regeneration des Kopfes als auch auf die Knospung stimulierend. Im Gegensatz dazu induziert der Rohextrakt zwar überzählige Tentakel im regenerierenden Kopf,

Tabelle 13

Beispiel		regenerierender Kopf: Zahl der Regenerate	regenerierender Kopf: mittlere Tentakelzahl/reg.Kopf	regenerierender Kopf: I (%)	Knospen: Zahl der Knospen/Regenerat	Knospen: mittlere Tentakelzahl/Knospe	Tier mit reg. Kopf + Knospen: mittlere Tentakelzahl/Tier (Knospe + reg. Kopf)	Tier mit reg. Kopf + Knospen: I (%)
(1)	Kontrolle	76	5,41	-	0,36	2,11	6,16	-
	Rohextrakt von 10 Hydren	55	6,03	11	0,26	1,36	6,38	4,5
	1 BU induz. gereinigte Substanz	71	6,0	11	0,60	2,0	7,19	14
(2)	Kontrolle	45	5,78	-	0,53	3,21	7,50	-
	Rohextrakt von 10 Hydren	45	6,44	11	0,31	2,30	7,20	0
	0,5 BU gereinigte Substanz	48	6,10	7	0,67	3,75	8,60	15
(3)	Kontrolle	30	5,60	-	3,1	4,98	20,4	-
	Rohextrakt von 10 Hydren	30	6,77	21	3,1	4,58	20,4	0
	1 BU gereinigte Substanz	29	6,79	21	3,3	5,04	23,3	14
	0,5 BU gereinigte Substanz	29	6,17	11	3,1	4,94	21,6	6

Beispiel 1 + 2 : Die Extrakte wurden auf Mittelstücken von Standardhydren (= Hydren ohne Knospen) getestet.

Beispiel 3 : Die Extrakte wurden auf Mittelstücken von Hydren mit je einer ausgewachsenen und einer gerade sichtbaren Knospe getestet.

aber er wirkt negativ auf die Knospung. Dies soll an den folgenden drei Beispielen gezeigt werden, in denen die Wirkung des Rohextrakts aus 10 Hydren (= 1 BU) mit der Wirkung von 1 BU (bzw. 0,5 BU) der gereinigten Substanz verglichen wird (Tabelle 13).

Während die induzierende Wirkung auf die Kopfbildung des Regenerats mit Rohextrakt und gereinigter Substanz gleich ist, ist der Effekt auf die Knospung verschieden. Der Rohextrakt wirkt hemmend auf die Zahl der Knospen pro Regenerat und auch auf die Zahl der Tentakel pro Knospe. Die gereinigte Substanz hingegen beschleunigt die Knospung, d.h. die Tentakel kommen schneller als in der Kontrolle. Außerdem werden zusätzlich Knospen induziert.

Diskussion

Aus vielen biologischen Versuchen geht hervor, daß es bei Hydra einen Gradienten an Kopfinduktionskapazität gibt. Es ist zu vermuten, daß diesem Gradienten an Kopfinduktionskapazität molekular ein Gradient einer oder mehrerer Substanzen zugrundeliegt, die induzierend auf die Kopfbildung wirken. Die in dieser Arbeit untersuchte Substanz entspricht in ihrem Vorkommen und ihren Eigenschaften einer solchen induzierenden Substanz. Teilstücke von Hydra, die mit dieser Substanz behandelt werden, regenerieren schneller und besser einen Kopf, d.h. mehr Tentakel in kürzerer Zeit, als unbehandelte Kontrolltiere. Gleichzeitig wirkt diese Substanz in ihrer gereinigten Form stimulierend auf die Knospung,

behandelte Tiere bilden auch schneller mehr Knospen. Ein Hinweis dafür, daß diese Substanz auch im Tier für die Kopfinduktion verantwortlich ist, ist die Korrelation zwischen der Konzentration dieser induzierenden Substanz im Tier und der mit anderen Methoden meßbaren Regenerations- und Knospungspotenz. Hydren, die eine niedrige Kopfinduktionskapazität haben, d.h. Hydren, die lange brauchen, um einen abgeschnittenen Kopf zu regenerieren, und Hydren, die nicht mehr in der Lage sind, sich ungeschlechtlich durch Knospung fortzupflanzen, enthalten auch sehr wenig dieser induzierenden Substanz.

Die induzierende Substanz wirkt noch in einer Konzentration, die dem Extrakt aus einer Hydra im Milliliter entspricht, d.h. in einer Verdünnung, die einem Tausendstel der Konzentration innerhalb des Tieres gleicht. Daraus kann man schließen, daß nur ein kleiner Teil der im Tier vorhandenen Substanz jeweils wirksam, d.h. frei diffusibel ist. Der größte Teil sollte gebunden vorliegen. Dies ist in Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden. Unter vorsichtigen Homogenisationsbedingungen kann man nachweisen, daß 90% der Aktivität an größere Strukturen gebunden ist. Der wirkliche Anteil ist wahrscheinlich noch höher, da man beim Aufarbeiten nicht vermeiden kann, daß bestimmte Zellstrukturen zerstört werden. Der größte Teil der Aktivität ist an eine Struktur gebunden, die mit 3 000 g sedimentiert, also sehr groß ist. Aus ihr läßt sich eine kleinere Komponente gewinnen, die erst bei 35 000 g sedimentiert, eine

Dichte von 1,09 und wahrscheinlich eine Größe von etwa 500 Å hat. Die Dichte von 1,09 weist auf einen hohen Lipidanteil hin, wie er für membranöse Partikel aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum charakteristisch ist, z.B. für Vessikel und sekretorische Granula.

Aus der strukturgebundenen Form läßt sich die aktive Substanz als niedermolekulare Komponente isolieren. Die aktive Komponente wurde etwa millionenfach angereichert. Sie hat ein Molekulargewicht von etwa 1000. Die Inaktivierung durch Pronase zeigt, daß sie ein Peptid ist oder enthält. Dem Molekulargewicht von 1000 würden 8-10 Aminosäuren entsprechen. Die chromatographischen und sonstigen Eigenschaften lassen vermuten, daß das Molekül eine oder mehrere aromatische, eine saure, eine basische und wahrscheinlich eine Aminosäure mit einer SH-Gruppe enthält.

Die induzierende Substanz liegt in Hydra als Gradient von oben nach unten vor. Die Kopfregion enthält etwa fünfmal mehr induzierende Substanz als die Fußregion. Diese gemessenen Konzentrationsunterschiede zwischen den verschiedenen Regionen betreffen im wesentlichen die strukturgebundene Substanz. Es konnte gezeigt werden, daß das Vorkommen der induzierenden Substanz positiv mit dem der Nervenzellen korreliert ist. Vergleicht man die Zellverteilung in verschiedenen Abschnitten von Hydra mit der spezifischen Aktivität des Rohextrakts aus den entsprechenden Regionen, so findet man, daß überall da, wo man im Rohextrakt eine Anhäufung der Aktivität nachweisen kann, auch

eine Anhäufung von Nervenzellen vorhanden ist. Eine ähnliche positive Korrelation ergibt sich mit keiner anderen Zellart. In der Kopfregion, die etwa 40-45% der Aktivität des Tieres enthält, ist auch ein Drittel aller Nervenzellen des Tieres konzentriert. Mehr als die Hälfte der Aktivität ist, wie auch die Nervenzellen, über das restliche Tier als Gradient verteilt. Die einzige Ausnahme in dieser Korrelation bildet die Fußregion, die zwar viele Nervenzellen, aber keine Aktivität besitzt. Auch zeitlich kann man das Auftreten der induzierenden Substanz mit dem der Nervenzellen korrelieren. Bei der Regeneration eines Kopfes kann man nach 24 Stunden Regenerationszeit einen steilen Anstieg sowohl der Aktivität als auch der Zahl der Nervenzellen feststellen. Entsprechendes wurde auch für die Induktion der Knospe nachgewiesen.

Man kann ausrechnen, wieviele Nervenzellen der Extraktkonzentration entsprechen, die jeweils für einen bestimmten Effekt, z.B. für eine Erhöhung der Tentakelzahl um 5%, notwendig ist. Unter sehr verschiedenen Bedingungen erhält man jeweils die gleiche Zahl, nämlich 600-1000 Nervenzellen. Eine Ausnahme bildet die Fußregion, deren Nervenzellen nicht aktiv sind. Die quantitative Korrelation spricht dafür, daß der größte Teil der Aktivität in Nervenzellen und nicht in oder an andere Zellen gebunden ist, und daß die Nervenzellen vermutlich die Produzenten der aktiven Substanz sind.

Zum direkten Beweis wurde versucht, die Tiere in Einzel-

zellen zu zerlegen und die verschiedenen Zellsorten mit physikalisch-chemischen Methoden voneinander zu trennen. Es gelang, die Nervenzellen in einer bestimmten Fraktion zehnfach anzureichern. Diese Fraktion bestand zu 50 % aus Nervenzellen im Vergleich zu 5 % im ungetrennten Zellgemisch. Diese Fraktion wies auch eine 15-20-fach höhere spezifische Aktivität als das ungetrennte Zellgemisch und als alle anderen Zellfraktionen auf. Es kann deshalb als ziemlich sicher angenommen werden, daß die Nervenzellen den größten Teil der induzierenden Substanz enthalten.

Bei der Isolierung eines Induktors stellt man sich immer wieder die Frage, ob man etwas Spezifisches angereichert hat, ob die isolierte Substanz auch dem echten Induktor im Tier entspricht. Die gereinigte Substanz wirkt in sehr geringen Konzentrationen - in einem Tausendstel der Konzentration innerhalb des Tieres - induzierend. Die Substanz konnte einmillion-fach angereichert werden, d.h. nur jedes millionste Molekül einer Hydra ist ein Peptid mit dieser spezifischen, induzierenden Wirkung. Um dann noch in einer Verdünnung von 1:1000 wirken zu können, sollte man annehmen, daß man das richtige Molekül, den Induktor oder eine aktive Komponente eines solchen Induktors isoliert hat.

Aus den obigen Befunden ergibt sich folgende Vorstellung der Induktionsvorgänge: In den Nervenzellen von Hydra (mit Ausnahme der Fußnervenzellen) wird eine niedermolekulare Substanz, wahrscheinlich ein Peptidhormon, gebildet. Der

größte Teil dieser Substanz ist in den Nervenzellen membrangebunden gespeichert. Aus der strukturgebundenen Form wird die niedermolekulare Substanz entweder ständig in niedriger Konzentration oder ab und zu als konstante Menge an die Umgebung abgegeben. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Abgabe der niedermolekularen Substanz aus den Nervenzellen reguliert ist, daß die in den Partikeln gespeicherte induzierende Substanz nur unter gewissen (Reiz)-Bedingungen freigesetzt wird. Für diese zweite Hypothese spricht der Befund, daß bei der Regeneration eines Kopfes - im Gegensatz zur Regeneration eines Fußes - in den ersten Stunden der Regeneration ein wesentlicher Teil der induzierenden Substanz verschwindet. Es könnte sein, daß diese freigesetzte induzierende Substanz die Kopfregeneration einleitet.

Über die Wirkungsweise der induzierenden Substanz ist nichts bekannt. Eine plausible Erklärung wäre, daß die induzierende Substanz auf die multipotenten großen interstitiellen Zellen einwirkt und deren Differenzierung in Nervenzellen verursacht. Sowohl bei der Regeneration eines Kopfes als auch bei der Knospung findet man als eine der ersten sichtbaren Differenzierungsleistungen eine Anhäufung von neugebildeten Nervenzellen. Diese Nervenzellen könnten ihrerseits neue Differenzierungsschritte einleiten. Die überzähligen Tentakel, die als Kriterium im Aktivitätstest verwendet wurden, sind möglicherweise eine solche sekundäre Folge zuviel induzierter Nervenzellen.

Ein Kopfinduktionsmechanismus, der primär auf einer Substanz mit einer Quellzellart, den Nervenzellen, einer Zielzellart, den großen i-Zellen, sowie einem Effekt, der Differenzierung von i-Zellen in Nervenzellen, beruht, kann vielleicht gewisse Teilschritte der Morphogenese in Hydra erklären. Um die morphogenetischen Prozesse vollständig verstehen zu können, muß man weitere Faktoren oder Wirkungsmechanismen in die Theorie einbeziehen. Wahrscheinlich gibt es in Hydra zusätzlich zu den stimulierenden auch inhibitorische Faktoren, die vermutlich durch ihr Zusammenwirken erst die eigentlichen morphogenetischen Prozesse steuern.

Zusammenfassung

Es wurde nachgewiesen, daß dem von vielen Autoren beschriebenen Gradienten an Kopfbildungspotenz ein Gradient einer Substanz zugrundeliegt, die stimulierend auf Kopfbildung und Knospung wirkt. Hydren mit niedriger Kopfbildungspotenz enthalten auch eine geringe Konzentration dieser induzierenden Substanz. Diese induzierende Substanz wurde eine Million-fach angereichert. Sie hat ein Molekulargewicht von etwa 1000 und ist oder enthält ein Peptid.

In Hydra liegt diese Substanz strukturgebunden vor, nur ein sehr geringer Anteil ist frei diffusibel. Die niedermolekulare Substanz ist in Nervenzellen an membranöse Partikel gebunden, die in ihrer Dichte und Größe den sekretorischen Vessikeln von Neurohormonen ähnlich sind.

Literaturangaben

Lesh, G.E. and A.L. Burnett, 1964. Some biological and biochemical properties of the polarizing factor in Hydra, Nature 204, 492-493.

Lesh, G.E. and A.L. Burnett, 1966. An analysis of the chemical control of the polarized form in Hydra, J. Exp. Zool. 163, 55-78.

Lentz, T.L., 1965. Induction of supernumerary heads by isolated neurosecretory granules, Science 150, 633-635.

Loomis, W.F. and H. Lenhoff, 1956. Growth and sexual differentiation of hydra in mass culture, J. Exp. Zool. 132, 555-568.

Müller, W.A., 1969. Die Steuerung des morphogenetischen Fließgleichgewichts in den Polypen von Hydractinia echinata, Roux' Archiv 163, 334-373.

Stusinsky, F., 1967. Neurosecretion, Springer-Verlag, Heidelberg.

Trembley, A., 1744. Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce, a bras en forme de cornes, J. & H. Verbeek, Leyden.

Webster, G. and L. Wolpert, 1966. Studies on pattern regulation in Hydra, J. Embryol. and Exp. Morph. 16, 91-142.

LEBENSLAUF UND BILDUNGSGANG

23.5.1937	geboren in Alzey/Rheinhessen
1943 - 1947	Volksschule in Alzey
1948 - 1957	Immanuel-Kant-Gymnasium in Rüsselsheim/Main
1957 - 1960	Studium am Dolmetscher-Institut der Universität Heidelberg
29.4.1960	Abschlußexamen als Diplom-Übersetzer Hauptfach: Englisch Nebenfach: Spanisch Sachfach: Gesellschaftsrecht
1960	Eheschließung
1961 - 1962	Aufenthalt in Madison, Wisconsin, USA Tätigkeit als freier Übersetzer
1963 - 1964	Tätigkeit als freier Übersetzer in Tübingen
1964 - 1968	Studium der Naturwissenschaften an der Universität Tübingen Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Biochemie, Zoologie
Okt. 1966	Doktorand am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Molekularbiologische Abteilung, bei Herrn Prof. Dr. A. Gierer. Thema der Dissertation: "Isolierung und Charakterisierung einer Substanz, die Kopfbildung bei Hydra induziert".